

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  <b>A61K 38/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/51321</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. November 1998 (19.11.98)						
<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01306</p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. Mai 1998 (08.05.98)</p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b></p> <table border="0"> <tr> <td>197 19 652.7</td> <td>9. Mai 1997 (09.05.97)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>PCT/DE98/01278</td> <td>7. Mai 1998 (07.05.98)</td> <td>WO</td> </tr> </table> <p><b>(34) Land für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:</b> DE</p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MERCKLE GMBH [DE/DE]; chem.-pharm Fabrik, Graf-Arco-Strasse 3, D-89079 Ulm (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b></p> <p><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> NAWROTH, Peter [DE/DE]; Heinholzstrasse 26, D-69207 Sandhausen (DE); NAKA-GAWA, Katsumi [JP/JP]; 4-21-201, Kagamiishicho, Okinayama, Kita-ku, Kyoto 603 (JP); ZHANG, Youming [-/DE]; Zimmer 23, Friedrich-Ebert-Anlage 51e, D-69117 Heidelberg (DE).</p> <p><b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		197 19 652.7	9. Mai 1997 (09.05.97)	DE	PCT/DE98/01278	7. Mai 1998 (07.05.98)	WO	<p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
197 19 652.7	9. Mai 1997 (09.05.97)	DE						
PCT/DE98/01278	7. Mai 1998 (07.05.98)	WO						
<p><b>(54) Title:</b> TISSUE FACTOR FOR INFLUENCING BLOOD VESSEL FORMATION</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> TISSUE-FAKTOR ZUR BEEINFLUSSUNG VON GEFÄSSBILDUNG</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>The invention relates to the use of tissue factor for influencing, in particular activating, the formation of blood vessels, above all for wound healing.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tissue-Faktor zur Beeinflussung von Gefäßbildung, insbesondere zur Aktivierung von Gefäßbildung, ganz besonders bei Wundheilung.</p>								

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### **Tissue-Faktor zur Beeinflussung von Gefäßbildung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tissue-Faktor zur Beeinflussung von Gefäßbildung, insbesondere zur Aktivierung von Gefäßbildung, ganz besonders bei Wundheilung.

5 Mittels Gefäßen wird der Körper mit Blut versorgt. Gefäße umfassen Endothel- und glatte Muskelzellen. Bei vielen Erkrankungen sind Gefäße bzw. deren Bildung beeinträchtigt. Solches findet sich z.B. bei gestörter Wundheilung, wie bei Diabetes mellitus, Vaskulitis, arterieller Verschlusskrankheit, chronischem venösen und infiziertem Ulcus. Auch gibt es große Probleme mit Wundheilung bei  
10 Innervationsstörungen, wie Paraplegie, Lepra, Neuropathie, etc., und Dekubitus von Pflegebedürftigen. Ferner sind Nahtschwächen und Wundheilungsstörungen bei Operationen, insbesondere des Darmes bzw. Transplantationen von Haut oder anderen Organen, bekannt. Bisher gibt es keine zufriedenstellenden Mittel, um bei Gefäßerkrankungen, insbesondere gestörter Wundheilung, eingreifen zu  
15 können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem vorstehendes erreicht werden kann.

20 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung von Tissue-Faktor zur Beeinflussung von Gefäßbildung, insbesondere zur Aktivierung von  
25 Gefäßbildung, ganz besonders bei Wundheilung.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß Tissue-Faktor in Wunden von Tieren zur Bildung von Gefäßen (Blutgefäßen) führt. Er

hat gefunden, daß die Gefäße Endothel- und glatte Muskelzellen aufweisen. Ferner hat er erkannt, daß mittels Tissue-Faktor Wundheilung erreicht werden kann. Des weiteren hat er gefunden, daß durch Inhibierung von Tissue-Faktor Gefäßbildung verhindert werden kann.

5

Tissue-Faktor ist ein Transmembran-Glykoprotein, das die Blutgerinnungsfaktoren VII bzw. VIIa bindet. Durch diese Bindung wird eine Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren X bzw. IX bewirkt, wodurch die Blutgerinnung über den extrinsischen bzw. intrinsischen Weg in Gang gesetzt wird. Tissue-Faktor hat ein Molekulargewicht von 43-46 kD. Seine Primärstruktur ist bekannt, ebenso das Gen für Tissue-Faktor und dessen Lokalisierung auf dem Chromosom (vgl. Scarpati, E.M., et al., Biochemistry 26, (1987), 5234-5238).

10

15

Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor zur Aktivierung von Gefäßbildung, insbesondere bei Wundheilung, verwendet. Der Ausdruck "Tissue-Faktor" betrifft einen Tissue-Faktor jeglicher Art und Herkunft. Es kann ein tierischer oder menschlicher Tissue-Faktor sein. Er kann glykosyliert oder nicht-glykosyliert sein. Auch kann es ein Fragment von Tissue-Faktor sein, das die Fähigkeit hat, Gefäße, insbesondere bei Wundheilung, zu bilden. Der Tissue-Faktor kann eine Wildtyp-Sequenz aufweisen. Auch kann seine Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz durch eine oder mehrere Aminosäuren verschieden sein. Ferner kann der Tissue-Faktor Teil eines Fusionsproteins sein.

20

25

In bevorzugter Ausführungsform liegt der Tissue-Faktor in Form einer exprimierbaren Nukleinsäure vor. Diese kann eine DNA und/oder RNA sein, wobei eine DNA, insbesondere eine genomische oder cDNA bzw. Fragmente davon, bevorzugt sind. Die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich des Tissue-Faktor gelten hier entsprechend für die Nukleinsäure.

30

Die Expression der Nukleinsäure kann in üblicher Weise erreicht werden. Günstig kann es sein, wenn die Nukleinsäure, z.B. als DNA, insbesondere cDNA, in einem Vektor vorliegt, der zur Expression in tierischen Zellen geeignet ist. Solche

Expressionsvektoren sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise können es Virus- oder Plasmid-Vektoren sein. Vorteilhaft ist es, wenn die Vektoren nicht in das Genom von Zellen integrieren, sondern episomal in den Zellen verbleiben. Damit wird eine transiente Expression des Tissue-Faktor erreicht, was bevorzugt ist. Ferner kann die Nukleinsäure als DNA, insbesondere cDNA, unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors stehen. Ein induzierbarer Promotor kann z.B. Gewebe-, Organ- und/oder Tumor-spezifisch sein. Günstig kann es sein, wenn die Nukleinsäure als DNA, insbesondere cDNA, unter der Kontrolle des CMV-Promotors z.B. in dem Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen), oder unter der Kontrolle des SV40 Promotors, z.B. in dem Expressionsvektor pSVK3 (Pharmacia) vorliegt. Solche mit pcDNA3-TF (Tissue-Faktor) bzw. pSVK3-TF bezeichnete Expressionsplasmide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Besonders vorteilhaft kann es sein, wenn die Nukleinsäure als DNA, insbesondere cDNA, in einem Sindbis-Virus-Replikon-Vektor vorliegt. Ein solcher Vektor erlaubt eine extrem hohe Expression der Nukleinsäure. Ein Beispiel eines solchen Vektors ist das ELVS-Vektor-System von Viagene Inc.. Ein mit ELVS-TF (Tissue-Faktor) bezeichnetes Expressionsplasmid ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Zur Herstellung eines vorstehenden Vektors wird der Fachmann auf bekannte Verfahren zurückgreifen. Ergänzend wird auf Maniatis, T., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 verwiesen.

Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor zur Aktivierung von Gefäßbildung, insbesondere bei Wundheilung, verwendet. Der Begriff "Gefäßbildung" betrifft eine Gefäßbildung jeglicher Art und an jeglicher Stelle. Beispielsweise betrifft es eine Gefäßbildung, um beeinträchtigte, z.B. alte, Gefäße zu ersetzen. Solche können z.B. im Gehirn oder Herz vorliegen, wodurch ein Schlaganfall bzw. Infarkt verhindert oder behandelt werden kann. Auch kann einer Altersdemenz vorgebeut werden. Ferner betrifft es eine Gefäßbildung bei der Behandlung von Arteriosklerose, M. Crohn und C. ulcerosa, diabetischer Retinopathie und tiefer Beinvenenthrombose/Ulcus cruris sowie der Verhinderung von Rezidiven. Insbesondere betrifft es eine Gefäßbildung und Wundheilung. Der Ausdruck "Wund-

heilung" betrifft eine Wundheilung jeglicher Art und an jeglicher Stelle. Es kann normale und gestörte Wundheilung sein. Letztere findet sich insbesondere bei Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Vaskulitis, arterieller Verschlusskrankheit, chronischem venösen und/oder infiziertem Ulcus sowie schlecht heilendem Magenulcus. Auch findet sich eine gestörte Wundheilung bei Innervationsstörungen, wie Paraplegie, Lepra, Neuropathie, etc., und Dekubitus bei Pflegebedürftigen. Des weiteren liegt eine gestörte Wundheilung vor, wenn Nahtschwächen und Heilungsstörungen nach Operationen, insbesondere des Darms und Transplantationen der Haut bzw. anderer Organe, auftreten. Darüberhinaus findet sich eine gestörte Wundheilung bei Knochenfrakturen, Verbrennungen und Behandlungen mit Steroiden.

Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor in Form eines Proteins oder einer exprimierbaren Nukleinsäure zur Aktivierung von Gefäßbildung, insbesondere bei Wundheilung, verabreicht. Günstig kann es sein, den Tissue-Faktor in Kombination mit weiteren die Gefäßbildung, insbesondere bei Wundheilung, fördernden Faktoren, wie z.B. "vascular endothelial growth factor" (VEGF), zu verabreichen. Diese Faktoren können ebenfalls in Form von Proteinen und/oder exprimierbaren Nukleinsäuren vorliegen. Die Verabreichung von Tissue-Faktor und den genannten Faktoren kann gleichzeitig oder nacheinander erfolgen. Die Art der Verabreichung von Tissue-Faktor alleine bzw. zusammen mit den genannten Faktoren kann sich am Wirkungsort, d.h. an der Stelle, wo eine Gefäßbildung, insbesondere bei Wundheilung, erfolgen soll, orientieren. Beispielsweise bietet es sich an, eine Stelle auf der Körperoberfläche lokal und eine im Inneren des Körpers systemisch zu behandeln. Zur Verabreichung von Tissue-Faktor alleine bzw. zusammen mit den genannten Faktoren können übliche Verfahren verwendet werden. Für die lokale Verabreichung ist es z.B. günstig, den oder die Faktoren in Liposomen zu verpacken oder auf Träger, insbesondere Goldpartikel, zu absorbieren und die Liposomen an der entsprechenden Stelle des Körpers aufzutragen bzw. die Träger, insbesondere Goldpartikel, in das Gewebe hineinzuschießen. Ferner werden für die Verabreichung von Tissue-Faktor alleine bzw. zusammen mit den genannten Faktoren pharmazeutische Zusammensetzungen

bereitgestellt, die übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Lösungsmittel, etc. enthalten können. Solche Zusammensetzungen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

5 Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor auch zur Inhibierung von Gefäßbildung verwendet. Hierzu kann der Tissue-Faktor in Form eines ihn inhibierenden Antikörpers vorliegen, ebenso kann der Tissue-Faktor in Form einer Nukleinsäure vorliegen, die eine "antisense"-Wirkung auf die Expression von Tissue-Faktor hat. Durch die Inhibierung von Gefäßbildung können insbesondere Tumorerkrankungen  
10 behandelt werden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Gefäßbildung zu beeinflussen. Insbesondere kann Gefäßbildung aktiviert werden. Die erhaltenen Gefäße umfassen Endothel- und glatte Muskelzellen. Somit eignet sich die vorliegende  
15 Erfindung zur Vorbeugung und Behandlung der verschiedensten Erkrankungen. Beispiele solcher sind vorstehend angegeben. Insbesondere eignet sich die vorliegende Erfindung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Wundheilungsstörungen, ganz besonders bei Diabetes mellitus, wo es möglich ist, große, offene Wunden an den Extremitäten zu heilen. Desweiteren kann mit der vor-  
20 liegenden Erfindung eine Gefäßbildung inhibiert werden. Somit eignet sich die vorliegende Erfindung auch, Erkrankungen, wie Tumorerkrankungen, zu behandeln. Die vorliegende Erfindung liefert einen großen Beitrag zur modernen Medizin.

## 25 Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt die Bildung von Gefäßen (Blutgefäßen) in Wunden, die mit einem Tissue-Faktor exprimierenden Vektor (a) transfiziert worden sind. (b) ist ein Vektor, der für einen "antisense" Tissue-Faktor  
30 kodiert, und (c) eine Kontrolle.

Fig. 2 zeigt die Bildung von Gefäßen in Wunden, die mit einem Tissue-

Faktor exprimierenden Vektor (a) transfiziert worden sind. (b) ist ein Vektor, der für einen "antisense" Tissue-Faktor kodiert, und (c) eine Kontrolle. Die Gefäße sind durch Hämatoxylin/Eosin-Färbung sichtbar gemacht (Fig. 2A). In Fig. 2B ist die Anzahl der Gefäße graphisch dargestellt.

5

**Fig. 3** zeigt das Vorliegen glatter Muskelzellen in neu gebildeten Gefäßen in Wunden, die mit einem Tissue-Faktor exprimierenden Vektor (a) transfiziert worden sind. (b) ist ein Vektor, der für einen "antisense" Tissue-Faktor kodiert, und (c) eine Kontrolle. Die Muskelzellen sind durch eine  $\alpha$ -Actin-Färbung sichtbar gemacht (Fig. 3A). In Fig. 3B ist die Stärke der Färbung graphisch dargestellt

10

Die vorliegende Erfindung wird durch das Beispiel erläutert.

15

**Beispiel:** Herstellung eines Tissue-Faktor exprimierenden Plasmids und seine Verwendung zur Beeinflussung von Gefäßbildung, insbesondere zur Aktivierung von Gefäßbildung, ganz besonders bei Wundheilung

5 (A) in die BamHI-Stelle der "multiple-cloning site" von pcDNA3 (Invitrogen) wurde die gesamte translatierte Region (1,8 kb) des Maus-Tissue-Faktor-Gens integriert. Damit stand diese Region unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es wurde das Expressionsplasmid pcDNA3-TF erhalten. In gleicher Weise wurde in der EcoRI-Stelle  
10 der "multiple-cloning site" von pcDNA3 die kodierende Region (0,7 kb) des Maus-Tissue-Faktor-Gens in "antisense" Richtung integriert. Damit stand diese Region ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es wurde das Expressionsplasmid pcDNA3-TF-AS erhalten.

15 Auf den Rücken von drei weiblichen NOD Mäusen (Bomholtgaard, Dänemark) wurden jeweils 6 mm "full thickness" Wunden im Abstand von 8 - 10 mm zueinander gesetzt. Diesen Wunden wurden Mischungen verabreicht, die 2 µg pcDNA3-TF (a), pcDNA3-TF-AS  
20 (b) bzw. pcDNA3 (Kontrolle (c) und jeweils 12 µg DOTAP-Transfektionsreagens (Boehringer Mannheim) enthielten. Die Wunden wurden mit Ohmann Opraflex bedeckt.

Zum Nachweis der Bildung von Gefäßen (Blutgefäßen) in den Wunden wurden 6 bzw. 8 Tage nach Verabreichung der Mischungen  
25 jeweils 300 µl Tinte (Nigrosin, Sigma) in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Danach wurden die Tiere getötet und die Hautpartien mit den Wunden unter dem Mikroskop untersucht.

30 Es zeigte sich, daß bei Verabreichung eines Tissue-Faktor exprimierenden Vektors (a) Gefäße (Blutgefäße) in Wunden gebildet und somit Wundheilung gefördert wird. Ferner zeigte sich, daß ein

"antisense" Tissue-Faktor die Bildung von Gefäßen inhibieren kann.

- 5 (B) Wie unter (A) beschrieben, wurden sechs NOD-Mäuse behandelt. Nach 6 bzw. 8 Tagen wurden die Tiere getötet und die entsprechenden Hautpartien unter dem Mikroskop untersucht, nachdem sie einer  $\alpha$ -Actinfärbung (mit Sm-Actin Antikörper von Dianova) unterzogen worden waren.
- 10 Es zeigte sich, daß in den gebildeten Gefäßen glatte Muskelzellen vorliegen.

**Patentansprüche**

- 5        1.    Verwendung von Tissue-Faktor oder einem Fragment davon zur Beeinflussung von Gefäßbildung.
2.    Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Beeinflussung eine Aktivierung von Gefäßbildung ist.
- 10       3.    Verwendung nach Anspruch 2, wobei es sich um die Gefäßbildung bei Wundheilung handelt.
4.    Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei es sich um die Wundheilung bei Diabetis mellitus, Vaskulitis, arterieller Verschlusskrankheit, chronischem venösem und infiziertem Ulcus, Innervationsstörungen, Dekubitus und Nahtschwächen bei Operationen handelt.
- 15       5.    Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei es sich um die Gefäßbildung bei Arteriosklerose, M. Crohn und C. ulcerosa, diabetischer Retinopathie und tiefer Beinvenenthrombose/Ulcus cruris handelt.
- 20       6.    Verwendung nach Anspruch 2, wobei es sich um die Gefäßbildung zum Ersetzen von beeinträchtigten Gefäßen handelt.
- 25       7.    Verwendung nach einem der Ansprüche 1-6, wobei der Tissue-Faktor oder ein Fragment davon als exprimierbare Nukleinsäure vorliegt.
8.    Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Expression der Nukleinsäure transient ist.
- 30       9.    Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, wobei die Nukleinsäure eine DNA

ist.

- 5           10.   Verwendung nach einem der Ansprüche 7-9, wobei die Nukleinsäure unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors steht.
11.   Verwendung nach einem der Ansprüche 7-10, wobei die Nukleinsäure in einem Sindbis-Virus-Replikon-Vektor vorliegt.
- 10       12.   Verwendung nach einem der Ansprüche 7-10, wobei die Nukleinsäure unter der Kontrolle eines CMV- oder SV40-Promotors steht.
13.   Verwendung nach einem der Ansprüche 1-12, wobei der Tissue-Faktor in einem Liposom oder auf einem Träger, insbesondere Goldpartikel, vorliegt.
- 15       14.   Verwendung nach einem der Ansprüche 1-13, wobei der Tissue-Faktor in Kombination mit weiteren die Bildung von Gefäßen fördernden Faktoren vorliegt.
- 20       15.   Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Faktoren als exprimierbare Nukleinsäuren vorliegen.
16.   Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei einer der Faktoren VEGF ist.
- 25       17.   Verwendung nach einem der Ansprüche 1-16, wobei der Tissue-Faktor in einer pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegt.
- 30       18.   Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Beeinflussung eine Inhibierung von Gefäßbildung ist.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der Tissue-Faktor in Form eines ihn inhibierenden Antikörpers vorliegt.
20. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der Tissue-Faktor in Form einer Nukleinsäure vorliegt, die eine "antisense"-Wirkung auf die Expression von Tissue-Faktor hat.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18-20, wobei die Gefäßbildung bei einer Tumorerkrankung inhibiert wird.

1/5

(a)



(b)



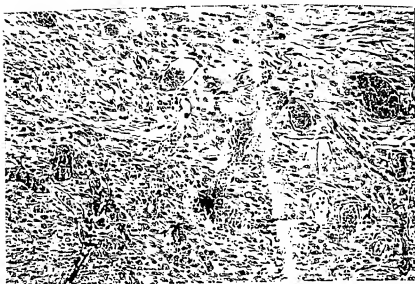
(c)



Fig. 1

2/5

(a)



(c)



(b)

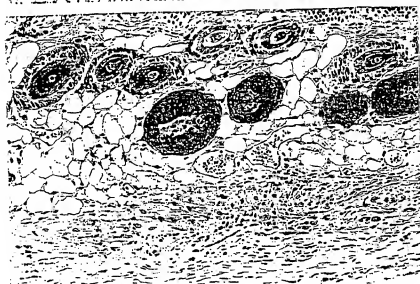


Fig. 2A

3/5

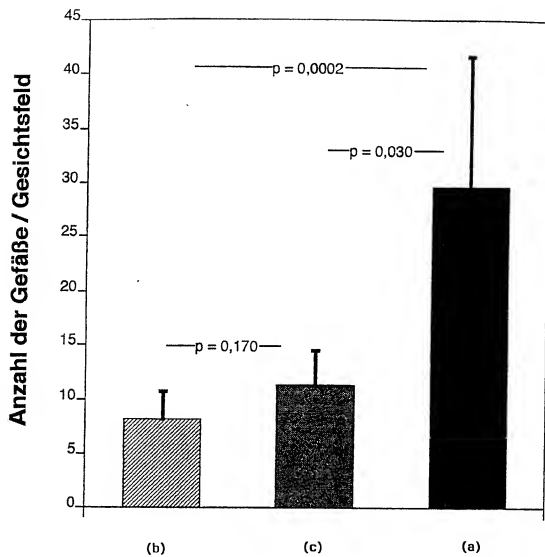


Fig. 2B

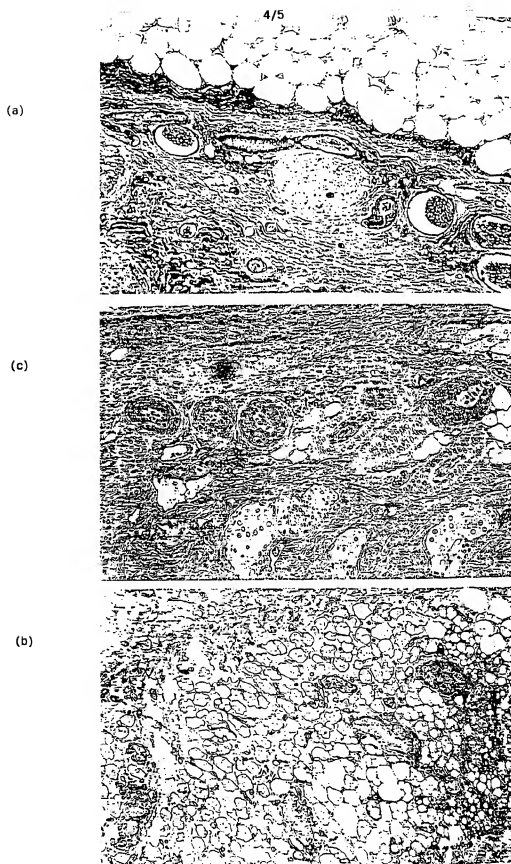
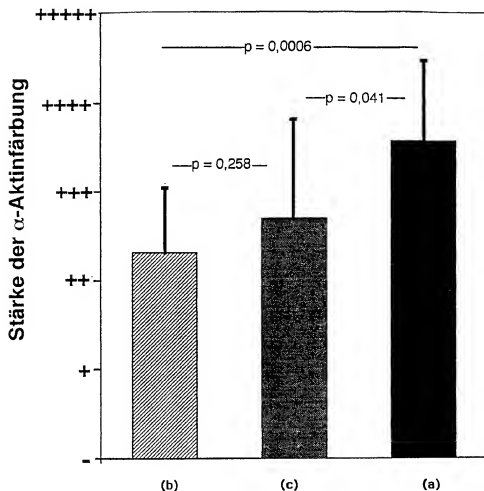


Fig. 3A

5/5



Graduierung der  $\alpha$ -Aktinfärbung:

- = keine Färbung
- + = schwache Färbung in einzelnen Bereichen der Gefäßwände
- ++ = schwache Färbung des gesamten Gefäßes
- +++ = teils schwache, teils starke Färbung der Gefäßwand
- ++++ = starke Färbung der gesamten Gefäßwand
- +++++ = sehr starke Färbung in allen Bereichen des Gefäßes

Fig. 38

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/01306

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K38/36 A61K39/395 A61K31/70 //C12N15/12, C07K14/745,  
(A61K38/36, 38:19)

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>2</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y. ZHANG ET AL.: "TISSUE FACTOR CONTROLS THE BALANCE OF ANGIOGENIC AND ANTIANGIOGENIC PROPERTIES OF TUMOR CELLS IN MICE." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 94, no. 3, September 1994, pages 1320-1327, XP002081086 NEW YORK, N.Y., US see the whole document ---	1,2, 7-18,20, 21
Y	WO 94 05328 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 17 March 1994 see claims 1-12,15-19; example IX ---	19
Y	WO 94 05328 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 17 March 1994 see claims 1-12,15-19; example IX ---	19

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 1998

Date of mailing of the international search report

02/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/DE 98/01306

## C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. SHOJI ET AL.: "TISSUE FACTOR (TF) REGULATES THE EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IN VITRO AND ANGIOGENESIS IN VIVO." BLOOD, vol. 88, no. 10 SUPPL 1 (PART 1 OF 2), 15 November 1996, page 514a XP002081087 NEW YORK, N.Y., US see abstract nr.2046 (107-IV) ---	1,2,7-17
X	M. SHOJI ET AL.: "MOLECULAR MECHANISMS LINKING THROMBOSIS AND ANGIOGENESIS IN CANCER." TRENDS IN CARDIOVASCULAR MEDICINE, vol. 7, no. 2, February 1997, pages 52-59, XP002081088 NEW YORK, N.Y., US see page 57, middle column, paragraph 3 ---	1,2
X	P. CARMELIET ET AL.: "ROLE OF TISSUE FACTOR IN EMBRYONIC BLOOD VESSEL DEVELOPMENT." NATURE, vol. 383, 5 September 1996, pages 73-75, XP002081089 LONDON GB see page 73, left-hand column, paragraph 1 ---	1,2
A	J. CONTRINO ET AL.: "IN SITU DETECTION OF TISSUE FACTOR IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS: CORRELATION WITH THE MALIGNANT PHENOTYPE OF HUMAN BREAST DISEASE." NATURE MEDICINE., vol. 2, no. 2, February 1996, pages 209-215, XP002081090 NEW YORK, N.Y., US see the whole document ---	1-21
A	J.N. WILCOX ET AL.: "LOCALIZATION OF TISSUE FACTOR IN THE NORMAL VESSEL WALL AND IN THE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 86, April 1989, pages 2839-2843, XP002081091 WASHINGTON US see the whole document ---	1-21
E	WO 98 34634 A (ENTREMED, INC.) 13 August 1998 see page 8, line 3 - line 10; claims ---	18,21
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/DE 98/01306

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>K. NAKAGAWA ET AL.: "THE ANGIOGENIC EFFECT OF TISSUE FACTOR ON TUMORS AND WOUNDS." SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS, vol. 24, no. 3, 1998, pages 207-210, XP002081092  NEW YORK, N.Y., US  see the whole document  -----</p>	1-21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/01306

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Observation: Although claims 1-21 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.**
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/DE 98/01306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9405328 A	17-03-1994	AU 5093593 A	29-03-1994
WO 9834634 A	13-08-1998	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01306

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K38/36 A61K39/395 A61K31/70 //C12N15/12,C07K14/745,  
(A61K38/36,38:19)

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a)</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Y. ZHANG ET AL.: "TISSUE FACTOR CONTROLS THE BALANCE OF ANGIOGENIC AND ANTIANGIOGENIC PROPERTIES OF TUMOR CELLS IN MICE." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 94, Nr. 3, September 1994, Seiten 1320-1327, XP002081086 NEW YORK, N.Y., US siehe das ganze Dokument ---	1,2, 7-18,20, 21
Y	WO 94 05328 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 17. März 1994 siehe Ansprüche 1-12,15-19; Beispiel IX ---	19
Y	WO 94 05328 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 17. März 1994 siehe Ansprüche 1-12,15-19; Beispiel IX ---	19

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>a)</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Versäumnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/11/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beednester

Ryckebosch, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. tionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01306

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	M. SHOJI ET AL.: "TISSUE FACTOR (TF) REGULATES THE EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IN VITRO AND ANGIOGENESIS IN VIVO." BLOOD, Bd. 88, Nr. 10 SUPPL 1 (PART 1 OF 2), 15. November 1996, Seite 514a XP002081087 NEW YORK, N.Y., US siehe Zusammenfassung nr.2046 (107-IV)	1,2,7-17
X	M. SHOJI ET AL.: "MOLECULAR MECHANISMS LINKING THROMBOSIS AND ANGIOGENESIS IN CANCER." TRENDS IN CARDIOVASCULAR MEDICINE, Bd. 7, Nr. 2, Februar 1997, Seiten 52-59, XP002081088 NEW YORK, N.Y., US siehe Seite 57, mittlere Spalte, Absatz 3	1,2
X	P. CARMELIET ET AL.: "ROLE OF TISSUE FACTOR IN EMBRYONIC BLOOD VESSEL DEVELOPMENT." NATURE, Bd. 383, 5. September 1996, Seiten 73-75, XP002081089 LONDON GB siehe Seite 73, linke Spalte, Absatz 1	1,2
A	J. CONTRINO ET AL.: "IN SITU DETECTION OF TISSUE FACTOR IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS: CORRELATION WITH THE MALIGNANT PHENOTYPE OF HUMAN BREAST DISEASE." NATURE MEDICINE., Bd. 2, Nr. 2, Februar 1996, Seiten 209-215, XP002081090 NEW YORK, N.Y., US siehe das ganze Dokument	1-21
A	J.N. WILCOX ET AL.: "LOCALIZATION OF TISSUE FACTOR IN THE NORMAL VESSEL WALL AND IN THE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 86, April 1989, Seiten 2839-2843, XP002081091 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument	1-21
E	WO 98 34634 A (ENTREMED, INC.) 13. August 1998 siehe Seite 8, Zeile 3 - Zeile 10; Ansprüche	18,21

---  
-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. .tionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01306

## C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>K. NAKAGAWA ET AL.: "THE ANGIOGENIC EFFECT OF TISSUE FCTOR ON TUMORS ND WOUNDS."</p> <p>SEMINARS IN THRMBOSIS AND HEMOSTASIS, Bd. 24, Nr. 3, 1998, Seiten 207-210, XP002081092</p> <p>NEW YORK, N.Y., US</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-21

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

...ernationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01306

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-21 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01306

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9405328 A	17-03-1994	AU 5093593 A	29-03-1994
WO 9834634 A	13-08-1998	KEINE	